

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26630052

研究課題名(和文) 単一細胞のRNAおよびDNA同時抽出・解析技術の開発

研究課題名(英文) Simultaneous extraction and analyses of RNA and DNA from single cells

研究代表者

新宅 博文 (SHINTAKU, HIROFUMI)

京都大学・工学研究科・助教

研究者番号：80448050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロ流路内における細胞の電気穿孔法および動電現象を利導した単一細胞のRNAおよびDNAの同時抽出・解析技術を開発した。開発したマイクロ流体システムは、細胞膜の溶解を200 ms、抽出および分離を約1分程度で完了し、高品質のRNAおよびDNA分子を出力できることを示した。構築したマイクロ流体システムをcytoplasmic RNAおよびnuclear RNAの並列次世代シーケンシング解析を実施し、それらの網羅解析が可能であることを示した。また、両者の対比からそれぞれの分画で変動している発現遺伝子や、イントロンの保持型に顕著な差異があることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have developed a novel extraction technique of RNA and DNA from single cells with electrical lysis and electrokinetics and demonstrated it with integrated analyses on RNA and DNA. The technique leverages a microfluidic system to enable selective lysis of cytoplasmic membrane in less than 200 ms and completes extraction and separation between cytoplasmic RNA and a nucleus in less than one minute. The extracted RNA and DNA molecules showed high quality to perform high-throughput sequencing analyses. We also demonstrated our techniques with integrated nuclear and cytoplasmic RNA sequencing analyses and proposed a new strategy to study RNA transport at single cell resolution.

研究分野：流体工学

キーワード：マイクロ流路 電気泳動 一細胞 RNA DNA シーケンシング 電気穿孔 前処理

1. 研究開始当初の背景

一細胞解析は、生体システムあるいは疾病の詳細メカニズムを理解する上で非常に重要であり、新しい医療診断・治療技術の開発に多に貢献することが期待される。現在の一細胞解析技術としては fluorescence-activated cell sorter (FACS) がその中心的役割を果たしている。FACS は解析対象に対して特異的に吸着するリポータ分子に蛍光標識を付け、それを用いて細胞を修飾し、各細胞の蛍光強度からその状態量を解析する方法である。一細胞の状態を高スループットで解析でき、一細胞の評価と同時に細胞群全体を定量的に評価できる点に強みがある。一方、マイクロ流体システムを利用した装置も近年その重要性を増しており、例えば Fluidigm 社の装置を利用した研究成果が多く発表されている。Fluidigm 社のシステムは polydimethylsiloxane (PDMS) 製の集積マイクロ流路を用いており、内部に多数のバルブ、ポンプ、反応チャンバ等を有している。FACS と比較した場合、例えば RNA/DNA の解析において、polymerase chain reaction (PCR)/ reverse transcription (RT)-PCR による増幅が出来る点で優れており、数コピーレベルの RNA を対象とした高感度の解析が可能である。

一般的に RNA の解析を行う場合は DNA はノイズとして影響するため、DNase により DNA を分解する。前述のマイクロ流体システムにおいては基本的に RNA/DNA の何方か一方のみを解析する方法が採用されており、現在利用可能な技術では一細胞の RNA および DNA を同時解析することは不可能である。しかし、近年、DNA から RNA に転写、そして RNA からタンパク質に翻訳されるとするセントラルドグマに未解明の制御機構があり、一細胞レベルで DNA および RNA の同時解析あるいは RNA および

タンパク質の同時解析による現象理解が必要であると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロ流路内における細胞の電気穿孔法および動電現象（電気泳動・電気浸透流）を利導した一細胞の RNA および DNA の分離および同時抽出・解析技術の開発を目指した。開発した方法は細胞の電気穿孔法および等速電気泳動法を融合させた方法であり、簡便な構造を有するマイクロ流路における高精度流れ場・電場制御により実施可能にした。また、等速電気泳動法に基づく分子濃縮により抽出過程に生じる分子拡散を抑え抽出効率を高めた。さらに、抽出技術と分子検出技術を融合し、高速および高感度の分子計測技術を開発した。

3. 研究の方法

cytoplasmic RNA (cytRNA) の純度および品質の評価：マイクロ流路から出力された cytRNA および gDNA のそれぞれについて reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) および qPCR を用いた解析を行った。RT-qPCR を用いた方法により cytRNA の逆転写および増幅の可否について検討した。また、RT-qPCR で cytRNA を定量し、オンチップの蛍光計測から得られた cytRNA 量との比較から、cytRNA の品質を評価した。cytRNA における gDNA の混入可能性および純度について検討するため gDNA をターゲットにした qPCR 法を実施した。

マイクロ流体システムの自動化：一細胞前処理を自動化および並列化するための基盤技術構築を目指し、マイクロ流路内部に一細胞を捕獲するためのトラップ構造を導入した。このトラップ構造は細胞の捕獲に加えて、局所的に電場を集中することで印可電圧を従来法の 1/10 程度に低減する。また、cytRNA の抽出時にはトラップ構造が核を保

持するため、従来法で不可欠であったシーピングマトリックスを不要にする。

次世代シーケンシング技術への展開：オリゴ(dT)プライマーを用いて cytRNA および nucRNA に含まれる mRNA の poly(A) tail から逆転写を行うとともに、テンプレートスイッチング法を用いた方法で全長 cDNA を作成した。その後、PCR により cDNA を増幅し、それらサンプルに対して次世代シーケンシング解析を実施した。

4. 研究成果

平成 26 年度は一細胞から cyt RNA および gDNA を同時に抽出し、cytRNA に対する qPCR の結果から、cytRNA サンプルにおける gDNA の混入量は qPCR の検出限界以下であり、抽出した cytRNA の純度が非常に高いことがわかった。また、RT-qPCR 解析から抽出した RNA 分子のほとんどが RT-PCR で増幅できる程度に品質を保っており、我々の開発した方法が様々な解析に応用できる可能性を示した。

平成 27 年度は、一細胞前処理を自動化および並列化するための基盤技術構築し、K562 細胞を利用して cytRNA の抽出効率および nucRNA の検出について検討した。定量方法には抽出した cytRNA に対してハウスキーピング遺伝子である GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) をターゲットとして RT-qPCR を用いた。検討の結果、抽出した cytRNA 量は 1 細胞あたり 19.8 pg であり、次世代シーケンシングへの適用等も十分可能であるという結果を得た。

平成 28 年度は構築したマイクロ流体システムを用いた cytRNA および nuc RNA の同時次世代シーケンシングへ展開した。解析の結果から、開発した方法は cytRNA と nucRNA の分画を高精度かつ高い再現性で実施可能であり、両者の対比からそれぞれの分画で発現量が変動している遺伝子や、イントロンの保持型に顕著な差異があることが

明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Kentaro Kuriyama*, Hirofumi Shintaku*, and Juan G. Santiago, Protocol for microfluidic system to automate the preparation and fractionation of the nucleic acids in the cytoplasm versus nuclei of single cells, *Bio-protocol*, Vol. 6, Issue 12, (2016), e1844. [* : Equal contributors]

Kentaro Kuriyama*, Hirofumi Shintaku*, and Juan G. Santiago, Isotachophoresis for Fractionation and Recovery of Cytoplasmic RNA and Nucleus from Single Cells, *Electrophoresis*, Vol. 36, Issue 14(2015) pp. 1658-1662. [* : Equal contributors]

Itsuo Hanasaki, Naoya Yukimoto, Satoshi Uehara, Hirofumi Shintaku, and Satoyuki Kawano, Linearization of Lambda DNA Molecules by Instantaneous Variation of the Trapping Electrode Voltage inside a Micro-channel, *Journal of Physics D: Applied Physics* Vol.48, No.13 (2015) 135402 (11 pages).

Hirofumi Shintaku, James W. Palko, Glenn M. Sanders, and Juan G. Santiago, Increasing Hybridization Rate and Sensitivity of Bead Based Assays Using Isotachophoresis, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 53 (2014), pp. 13813-13816.

Hirofumi Shintaku and Juan G. Santiago, Extraction and Fractionation of RNA and DNA from Single Cells Using Selective Lysing and Isotachophoresis, SPIE Photonics West BiOS, Proc. of SPIE Vol. 9320, San Francisco, CA, USA, 7th-12th February (2015), 93200Q.

[学会発表](計 17 件)

Hirofumi Shintaku, Electrical fractionation

of cytoplasmic and nuclear nucleic acids of single cells, Fundamentals and Applications of Microfluidic Compartmentalization, June 13th-16th (2017).

Hirofumi Shintaku, A microfluidic system for integrated analyses on nuclear and cytoplasmic nucleic acids of single cells, The 12th Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, IEEE-NEMS 2017, Los Angeles, CA, April 11th (2017).

Mahmoud Nady Abdel-Moez Atta, Kei Iida, Yusuke Oguchi, Sotaro Uemura, Juan G. Santiago, and Hirofumi Shintaku, Integrated nuclear and cytoplasmic RNA sequencing of single cells, Advances in Genome Biology and Technology (AGBT) General Meeting, Hollywood, FL, USA, 13th-16th, February (2017).

Hirofumi Shintaku, Electrical Fractionation of Cytoplasmic RNA And Nucleus From Single Cells For Parallel RNA and DNA Analyses, 2nd Annual Next Generation Sequencing & Single Cell Analysis USA Congress, Boston, MA, USA, October 4th (2016).

Sangamithirai Subramanian Parimalam, Ruji Yokokawa, Hidetoshi Kotera and Hirofumi Shintaku, Massively parallel quantification of miRNA in single cells via duplex-specific nuclease reaction in pico-liter wells, 2016 International conference of Microfluidics, Nanofluidics, and Lab-on-a-chip, Dalian, China, 10th June (2016), pp.287-288(Track13-292).

Hirofumi Shintaku, Kentaro Kuriyama, and Juan G. Santiago, On-Chip Electrical Lysis and Extraction of Cytoplasmic RNA and Genomic DNA from Single Cells, 28th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, Toyama, Japan, November 12th (2015), 12A-5-2.

Hirofumi Shintaku and Juan G. Santiago, On-Chip Preparation System for Simultaneous

Cytoplasmic RNA and Genomic DNA Analyses of Single Cells, the 3rd Annual Single Cell Analysis Investigators Meeting, Bethesda, MD, USA, 20th-21st April (2015).

Hirofumi Shintaku, "Microfluidic System for Simultaneous Analyses of RNA and DNA in Single Cells," Berkeley Nanosciences and Nanoengineering Institute Seminar, Berkeley, CA, USA, February 27th (2015).

Hirofumi Shintaku, and Juan G. Santiago, "Extraction and Fractionation of RNA and DNA from Single Cells Using Selective Lysing and Isotachopheresis," SPIE Photonics West BiOS, San Francisco, CA, USA, February 7th-12th (2015).

Hirofumi Shintaku, Kentaro Kuriyama, and Juan G. Santiago, "Microfluidic System for Correlation Analyses of RNA and DNA in Single Cells," Cold Spring Harbor Asia Conferences, Single Cell, Suzhou, China, December 8th-12th (2014).

Hirofumi Shintaku, James W. Palko, Glenn M. Sanders, and Juan G. Santiago, "Coupling Isotachopheresis with Bead-Based Assay for Rapid and Multiplexed Nucleic Acids Detection," Lab-on-a-Chip Asia - Microfluidics and Point Of Care Diagnostics, Singapore, November 20th-21st (2014).

Hirofumi Shintaku, "Sample Preparation for Simultaneous Analysis of RNA and DNA from Single Cells Using Electrophoretic Techniques," 2nd Annual Single Cell Genomics & Transcriptomics Asia Congress 2014, Singapore, October 7th-8th (2014).

Kentaro Kuriyama, Hirofumi Shintaku, and Juan G. Santiago, Development of Microfluidic System for Isolation and Analyses of RNA and DNA from Single Cells, 2nd Annual Single Cell Genomics & Transcriptomics Asia Congress 2014, Singapore, 7th-8th October (2014).

Hirofumi Shintaku, Kentaro Kuriyama, Hidekazu Nishikii, Lewis A. Marshall, Hidetoshi Kotera, and Juan G. Santiago, “Correlating DNA and RNA Amounts in Single Cells Using Selective Lysing and Isotachopheresis,” SCIX 2014, p.227, Reno, Nevada, USA, October 1st (2014).

新宅 博文，藁谷卓哉，小口祐伴，上村想太郎，マイクロオリフィスを用いた一細胞 RNA および DNA 同時前処理法，日本機械学会日本機械学会 2016 年度年次大会，J0540302，福岡，2016 年 9 月 13 日。

畑 翔太，Mahmoud Nady Abdel-Moez Atta，横川 隆司，小寺 秀俊，新宅 博文，等速電気泳動を用いた一細胞スケール RNA 抽出における効率の評価，日本機械学会 2016 年度年次大会，J0540301，福岡，2016 年 9 月 14 日。

畑 翔太，横川 隆司，小寺 秀俊，新宅 博文，電気穿孔および等速電気泳動を用いた一細胞前処理技術における RNA 純度計測，日本機械学会 2015 年度年次大会，J0540101，札幌，2015 年 9 月 14 日。

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/kyotouniversitymicrofluidics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新宅 博文(SHINTAKU, Hirofumi)
京都大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号 80448050

(2) 研究分担者

小寺 秀俊(KOTERA, Hidetoshi)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号 20252471

(3) 研究協力者

Juan G. Santiago
Stanford University・教授

錦井秀和 (NISHIKII, Hidekazu)
Stanford University・Visiting Scholar
筑波大学・医学医療系・助教